

**Pharmaceutical preparations for the stabilization of interferon alpha.**

Patent  
Number: EP0231816

Publication  
date: 1987-08-12

Inventor(s): FRANZ HELMUT DR

Applicant(s):: THOMAE GMBH DR K (DE)

Requested  
Patent: ☐ EP0231816, A3, B1

Application  
Number: EP19870100792 19870121

Priority  
Number(s): DE19863603444 19860205

IPC  
Classification: A61K45/02 ; A61K47/00

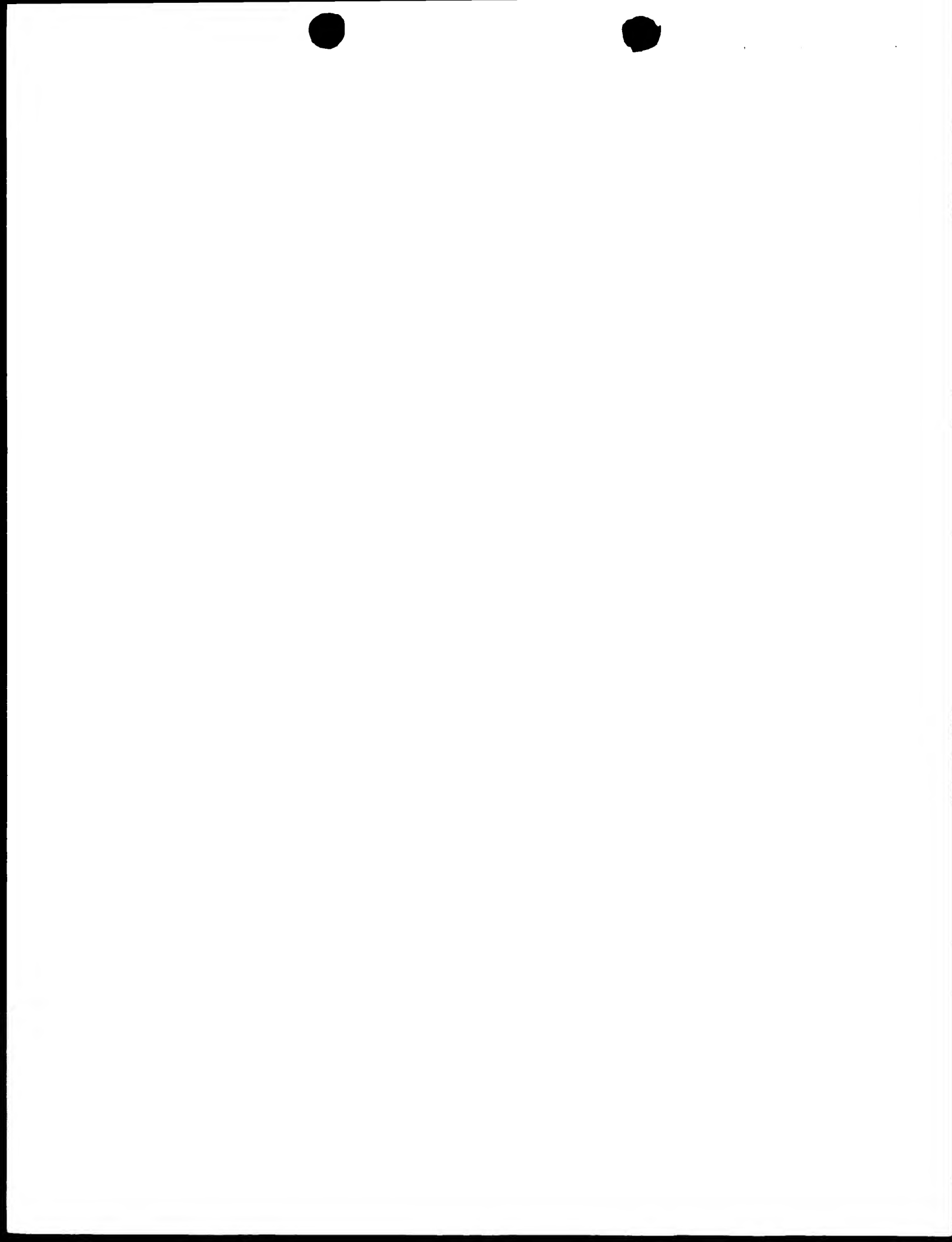
EC  
Classification: A61K38/21A, A61K47/32, A61K47/38, A61K47/42

Equivalents: AU601712, AU6829287, CA1295242, DD284602, ☐ DE3603444, ☐ DK164202B,  
DK164202C, DK58387, ES2028796T, ☐ FI86144B, ☐ FI86144C, FI870457,  
GR3002270T, HU43494, IE59697, ☐ JP62209024, NO169638B, NO169638C,  
NO870441, NZ219169, PH24377, ☐ PT84243, ZA8700793

**Abstract**

The pharmaceutical forms are intended for topical administration and employ as vehicle for and stabiliser of the active ingredient a composition which specifically confers special stability on the active ingredient IFN alpha. The forms are essentially composed of hydroxyethylcellulose and gelatin and preferably contain highly purified IFN alpha which has been prepared by DNA recombination as active ingredient.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



①



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪

Veröffentlichungsnummer:

**0 231 816  
A2**

⑫

# **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑰

Anmeldenummer: 87100792.8

⑤

Int. Cl. 4: **A61K 45/02**, **A61K 47/00**

⑱

Anmeldetag: 21.01.87

|  |   |
|--|---|
| <p>③ Priorität: <b>05.02.86 DE 3603444</b></p> <p>④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:<br/><b>12.08.87 Patentblatt 87/33</b></p> <p>⑥ Benannte Vertragsstaaten:<br/><b>AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE</b></p> | <p>⑦ Anmelder: <b>Dr. Karl Thomae GmbH</b><br/><b>Postfach 1755</b><br/><b>D-7950 Biberach (Riss)(DE)</b></p> <p>⑧ Erfinder: <b>Franz, Helmut, Dr.</b><br/><b>Obere Au 2</b><br/><b>D-7950 Biberach 1(DE)</b></p> |
|--|---|

⑤

**Pharmazeutische Zubereitungsformen zur Stabilisierung von Interferon alpha.**

⑤

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Zubereitungsformen für die topische Anwendung zur Stabilisierung des darin enthaltenen Wirkstoffs Human Interferon alpha (IFN alpha), wobei als Wirkstoffträger und Wirkstoffstabilisator eine neuartige Komposition eingesetzt wird, die speziell dem therapeutisch aktiven Wirkstoff IFN alpha eine besondere Stabilität verleiht. Im Einzelnen bezieht sich die Erfindung auf Zubereitungsformen, die im Wesentlichen aus Hydroxyäthylcellulose und Gelatine zusammengesetzt sind und die als therapeutisch aktiven Wirkstoff vorzugsweise hochgereinigtes IFN alpha enthalten, welches durch DNA-Rekombination hergestellt wurde.

**EP 0 231 816 A2**

### Pharmazeutische Zubereitungsformen zur Stabilisierung von Interferon alpha

Abhängig von ihren biologischen und chemischen Eigenschaften und ihrem Synthesort werden Human-Interferone und Interferone allgemein in drei Gruppen unterteilt, die mit Interferon alpha, Interferon beta und Interferon gamma bezeichnet werden entsprechend IFN alpha, IFN beta, IFN gamma. Der Synthesort von IFN alpha, auf das sich die vorliegende Erfindung bezieht, sind die Leucozyten, die nach Stimulation oder Induktion durch entsprechende Induktoren (z. B. Viren oder poly I<sup>\*</sup> poly C)) IFN alpha synthetisieren und freisetzen. Mit geeigneten DNA-Sequenzen transformierte Bakterien können IFN alpha synthetisieren, die eine dem genuinen Human IFN alpha analoge biologische Aktivität besitzen, mit dem Vorteil, daß hochgereinigte und im Wesentlichen von Kontaminationen freie Proteine in vergleichsweise großen Mengen erhalten werden können, die für die klinische Anwendung, z.B. gegen verschiedene Virusinfektionen und Malignome, einsetzbar sind.

Alle bekannten Interferone wirken antiviral, antiproliferativ und -jedoch verschieden stark -immunmodulierend. Anfänglich als antivirales Agens erkannt, wird heute ihr therapeutischer Nutzen auch als antineoplastisches Mittel gesehen.

Hinsichtlich Wirkungsqualität und Nebenwirkungsrate kommt der Applikationsroute eine besondere Bedeutung zu. Gerade bei der systemischen Anwendung von Interferonen imponieren die Nachteile, da sie nicht nur das Zielgewebe, sondern auch gesunde, nicht infizierte oder nicht transformierte Zellen oder Organe erreichen und beeinflussen und daher Nebenwirkungen erzeugen, die einem intravenösen oder intramuskulären Einsatz entgegenstehen können. Außerdem zeigte die systemische Applikation nicht immer die erwünschte Effektivität. In einzelnen Fällen mag eine direkte Injektion zwar möglich sein, das Mittel der Wahl, z. B. bei Virus- oder tumorbedingten malignen oder anderen mit Interferon therapierbaren Erkrankungen, die einer äußerlichen und lokalen Behandlung zugänglich sind (z. B. Haut, Augen, Nase), ist aber eher die topische Anwendung von Interferon bzw. von IFN alpha, auf das sich diese Erfindung bezieht. In jüngster Zeit wurde von verschiedenen Seiten über die topische Applikation von Human-Leucocyten-Interferon, synonym mit IFN alpha, berichtet, wobei überraschenderweise eine hohe Erfolgsquote bei verschiedenen malignen Erkrankungen festgestellt werden konnte (z. B. Ikic et al, Lancet, 1022-24, 1981, Vol.I ; Ikic et al., Lancet 1025-27, 1981, Vol.I). Es ist abzusehen, daß der topischen Anwendung von Interferon alpha zur Behandlung verschiedener viraler oder tumorbedingter Erkrankungen in Zukunft ein zunehmender medizinischer Stellenwert zukommen wird.

Mit der topischen Anwendung von IFN alpha als auch allgemein von Interferonen sind unter verschiedenen Gesichtspunkten erhebliche Schwierigkeiten verbunden. Unter dem Gesichtspunkt der pharmazeutischen Formulierung ist zu fordern, daß das biologisch aktive IFN alpha eine genügend hohe Stabilität erhält, um über eine ausreichend lange Zeit sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Körpertemperatur zu wirken bzw. über einen geeigneten Zeitraum von mehreren Stunden "in situ" wirksam zu bleiben. Bekannt ist, daß IFN alpha ein sehr temperaturinstabiles Protein ist. Erhebliche Aktivitätsverluste von bis zu 80% wurden innerhalb von wenigen Wochen bei 4° C bei einem Human-Leucocyten-Interferonhaltigen Gel beobachtet, das als Gelkomponente Carboxymethylcellulose enthielt (Moller B.R. et al., Obstetrics & Gynecology 62, 625-629, 1983) und für die topische Anwendung zur Behandlung des Carcinoma in situ der Cervix eingesetzt wurde.

Die daher notwendigen stabilitätserhaltenden Komponenten müssen so beschaffen sein, daß sie weder Unverträglichkeitsreaktionen am Ort der Applikation verursachen, denkbar durch Wirkung von biologisch aktiven Fremdstoffen, noch die Penetration von IFN alpha beeinträchtigen oder die Diffusion verhindern.

In der letzten Zeit wurden verschiedene Komponenten zur Stabilisierung von Interferon benutzt, wobei Estis, Evans und Testa Hydroxyäthylcellulose als Trägermaterial zur Herstellung von Interferon-haltigen Gelen oder Salben eingesetzt haben, aber erhebliche Aktivitätsverluste von IFN alpha, IFN beta oder IFN gamma unter anwendungsrealistischen Bedingungen nur durch Zusatz eines Proteaseinhibitors verhindern konnten (EP-A-0 142 345).

Dem Fachmann ist bekannt, daß mit Hydroxyäthylcellulose ein zur Herstellung von Gelen dieser oder auch anderer Art bestgeeignetes Mittel, z. B. aufgrund seiner Hitzestabilität, vorliegt und kommerziell erhältlich ist.

Der besondere Vorteil von Hydroxyäthylcellulose zur Herstellung einer IFN alpha-haltigen Matrix liegt gegenüber anderen Trägern darin, daß sie bei Siedetemperatur von Wasser nicht koaguliert bzw. geliert, gut wasserlöslich ist, und daß die Viskosität einer solchen Lösung mit abnehmender Temperatur zunimmt.

Eine Stabilisierung von Interferon bzw. von IFN alpha durch Hydroxyäthylcellulose allein und unter physiologischen Temperaturen ist nicht zu erreichen. Auch ist dem Fachmann bekannt, daß nicht hochgereinigte und daher kontaminierte Proteinpräparate -wie z.B. Interferone - unter geeigneten Bedingungen der Hydrolyse durch Proteasen ausgesetzt sind. Andere Versuche, in pharmazeutischen Präparaten enthaltene Interferone eine geeignete Stabilität zu verleihen, wurden von Akagi, Miura und Hoshino (EP-A-0 150 067) mit von Hydroxyäthylcellulose chemisch unterschiedlichen Polysacchariden, wie Dextran und Hydroxyäthylstärke unter Zusatz von Human Serum Albumin, von Mono-oder Disacchariden oder von Aminosäuren durchgeführt, wobei Präparate vornehmlich für die parenterale, systemische Anwendungsroute via intravenöser oder intramuskulärer Injektion beschrieben wurden. Darüber hinaus wurde von Terano nur allein auf Basis einer chemisch modifizierten Gelatine, ebenfalls für ein zu injizierendes pharmazeutisches Interferon-Präparat, eine Stabilisierung von Interferon in wässriger Lösung beschrieben, um damit Human Serum Albumin als bekanntes Interferonstabilisierendes Mittel für die Injektion zu substituieren (EP-A-0 162 332). Es ist dem Fachmann seit langem bekannt, daß Gelatine per se einen auf Interferone stabilisierenden Effekt aufweist (Sedmak J.J. and Grossberg, S.E. Tex. Rep. Biol. Med. 41, 274-279, 1982), und daß Gelatine und chemisch modifizierte Derivate davon auf einige andere biologische Proteine einen gewissen stabilisierenden Effekt ausüben (z.B. DE-A-1 118 732, EP-A-0 156 242).

Für die Stabilisierung von Interferon in Gelen, Salben, Suppositorien, Sprays usw. zur topischen Anwendung sind auch verschiedene Zuckeralkohole wie Glycerol, Erythritol, Arabitol, Xylitol, Sorbitol und Mannitol sowie verschiedene Zuckersäuren wie Iduronsäure, Galacturonsäure und andere Uronsäuren, Ascorbinsäure und deren Salze als auch verschiedene organische Puffersysteme wie Citratpuffer, Succinat puffer, Tartratpuffer, Fumaratpuffer, Glyconatpuffer, Oxalatpuffer, Lactatpuffer und Acetatpuffer offenbart worden, in Verbindung mit verschiedenen pharmazeutischen Trägerstoffen wie Wachse, Natriumcarboxymethylcellulose, Carboxyvinyl-derivate und Wasser (EP-A-0 080 879).

Diese letztgenannten als auch die vorhergenannten Interferon-stabilisierenden Komponenten sowie vor allem die Zusammensetzungen der pharmazeutischen Formulierungen und deren Anwendungsmodalitäten - (z.B. EP-A-0 162 332) sind grundsätzlich verschieden von der vorliegenden Erfindung und mit dieser nicht vergleichbar.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine Trägermatrix für hochgereinigtes Interferon alpha, speziell für rekombinant hergestelltes IFN alpha zu finden, die mindestens den obig aufgezählten Anforderungen entsprechen und zum anderen eine sowohl unter herstellungstechnischen als auch unter ökonomischen Gesichtspunkten so günstig wie mögliche, d.h. einfache Zusammensetzung, aufweisen sollte, ohne eine Einbuße einer geforderten optimalen Wirksamkeit des in der Trägermatrix enthaltenen biologisch aktiven Wirkstoffes IFN alpha zur topischen Anwendung zu bewirken. Durch die vorliegende Erfindung wurde dieser Aufgabenkomplex dadurch gelöst, daß Hydroxyäthylcellulose und Gelatine in bestimmten Mischungsverhältnissen miteinander vereint wurden und somit ein Träger und Stabilisator für IFN alpha geschaffen werden konnte, der die oben beschriebenen Anforderungen nicht nur erfüllt, sondern überraschenderweise dem IFN alpha eine besonders stabile biologische Aktivität verleiht und somit bestens für die topische Anwendung von hochgereinigtem insbesondere über rekombinante DNA-Technologie hergestelltem IFN alpha geeignet ist.

Ein weiterer Vorteil dieser Erfindung besteht darin, daß der gefundene Träger/Stabilisator-Komplex frei von Human Serum Albumin ist, das bekannterweise und insbesondere bei der topischen Anwendung gerade über längere Zeiträume zu lokalen Immunreaktionen bis zu Allergosen führen kann. Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auf eine verbesserte pharmazeutische Formulierung für die topische Anwendung von IFN alpha. Erfindungsgemäß wurde dabei festgestellt, daß beide als Träger und Stabilisator fungierenden Einzelkomponenten zusammen, nämlich Hydroxyäthylcellulose und Gelatine, eine über das zu erwartende Maß hinausgehende aktivitätserhaltende Wirkung auf IFN alpha ausüben, wobei gerade Berücksichtigung finden muß, daß IFN alpha und Interferone allgemein dafür bekannt sind, z.B. gegenüber physikalischen Einflüssen, instabile Proteine zu sein -sowohl in "nackter" Form als auch inkorporiert in anderen Gelmatrizes (z. B. Moller B.R. et al., siehe oben), so daß den erfindungsgemäßen Zubereitungsformen überraschend und in unvorhersehbarer Weise ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Stabilitätserhöhung von IFN alpha eigen bzw. inhärent ist. Somit dient die Gelatine in der vorliegenden Erfindung nicht für sich allein als stabilisierendes Mittel, sondern entfaltet erst im Komplex zusammen mit Hydroxyäthylcellulose den festgestellten und erstaunlichen synergistischen Stabilisierungseffekt für IFN alpha, auf den sich diese Erfindung bezieht.

55

Die erfindungsgemäßen, topisch zu applizierenden pharmazeutischen Zubereitungsformen für IFN alpha werden vorzugsweise als Virusstatika angewendet, wobei der therapeutische Einsatz im dermalen, nasalen, ophthalmischen und intravaginalen Bereich, z.B. bei Herpes labialis, Herpes genitalis inclusive Papilloma-Infektionen, Warzen und bei Herpes Zoster-Infektionen, erfolgt. Der Anwendungsumfang umfaßt auch die topische Behandlung von Paracancerosen und Cancerosen.

Gegenstand dieser Erfindung sind topisch anzuwendende pharmazeutische Zubereitungsformen mit einer Stabilisierung des darin enthaltenen Wirkstoffs Human Interferon alpha (IFN alpha), bestehend aus 1. einem Träger und Stabilisator im Komplex für den Wirkstoff, 2. einem Antiadhäsionsmittel und 3. gegebenenfalls sonstigen üblichen Wirkstoffen wie Puffer und Salze, Feuchthalter, Konservierungsstoffe, Penetrationsförderer, Vehikel.

Als Träger und Stabilisator für IFN alpha werden bekannte Stoffe wie Cellulosederivate (Carboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose) sowie Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure-Polymerisate (Carbopol® und Mischungen davon zusammen mit Gelatine, sauer oder alkalisch aufgeschlossen, eingesetzt. Als bevorzugter Träger und Stabilisator für IFN alpha wird Hydroxyäthylcellulose mit einem Substitutionsgrad von 2,5 in bestimmten Mischungsverhältnissen von jeweils 0,1 bis 2 Gew.% und Gelatine von 0,1 bis 10 Gew.%, jeweils bezogen auf das fertige Produkt, benutzt. Verwendet man Polyvinylalkohole sowie Polyvinylpyrrolidon, so werden bis 15 Gew.% hiervon eingesetzt. Damit wird eine besondere Stabilisierung speziell von IFN alpha erreicht, wie es auch die durchgeführten Versuche über das Stabilitätsverhalten beispielhaft belegen und wie es die in Abb. 1 bis 3 gezeigten Kurvenverläufe, die einen Versuchszeitraum von 14 Wochen bei Lagertemperaturen jeweils von -10, +4 und +21°C umfassen, beispielhaft zeigen.

Als Antiadhäsionsmittel zur besseren Spreitung der Gele und als antiadhäsive Filtrationshilfe können anionaktive, kationaktive sowie neutrale oberflächenaktive Substanzen benutzt werden, vorzugsweise werden polyäthoxylierte Sorbitan-Ester wie Polysorbat 20, 60, 80 benutzt. Als anorganische und organische Pufferlösungen haben sich mit einem für IFN alpha -Präparationen optimalen pH im Bereich von 6,5 bis 7,4 Natriumphosphat-Puffer, Kaliumhydrogenphosphat-Natriumdihydrogenphosphat-Puffer sowie Citronensäurephosphat-Puffer, Kalium-Natrium-glutamat-phosphat-Puffer und Succinat-Puffer bewährt.

Für die erfindungsgemäßen IFN alpha haltigen Zubereitungsformen eignen sich Feuchthaltesubstanzen wie Glycerin, 1,2-Propylenglykol, Sorbit, Butylenglykol sowie Polyole (z. B. Polyethylenglykol 400).

Geeignete hautverträgliche Konservierungsstoffe sind z. B. p-Hydroxybenzoesäureester (Nipa-Ester), vorzugsweise p-Hydroxybenzoesäuremethylester; des weiteren Benzoesäure, Sorbinsäure, Chlorhexidindigluconat, Benzalkoniumchlorid und Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimoniumbromid).

Ein geeigneter mit IFN alpha 2 kompatibler Penetrationsförderer ist bis zu 50 Gew.% Dimethylsulfoxid - (DMSO).

Als Vehikel ist bei nichtalkoholischen Hydrogelen Wasser bestens geeignet.

Geeignete pharmazeutische Formen für die topische Anwendung auf der Haut, im Auge oder in der Nase oder sonstigen Körperhöhlen sind z. B. Hydrogele. Diese enthalten im allgemeinen 0,1 bis 2,0 Gew.% sowohl an Gelatine als auch an Cellulosederivaten und/oder Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon oder Polyacrylsäure -Polymerisate, wobei die Verhältnisse je nach gewünschter Viskosität aufeinander abgestimmt werden müssen. Verwendet man Polyvinylalkohole oder Polyvinylpyrrolidon, so können hiervon bis zu 15 Gew.% erforderlich werden. Im Falle der Fertigung von Vaginalkugeln ist der Anteil an Gelatine bis auf 10 Gew.% zu erhöhen, ebenfalls in Abhängigkeit von der gewünschten Viskosität.

In den folgenden Beispielen wird die Herstellung von topisch anzuwendenden pharmazeutischen Zubereitungsformen zur Stabilisierung des darin enthaltenen IFN alpha im Detail beschrieben, die sich gemäß der vorliegenden Erfindung in der Hauptsache aus Cellulosederivaten und Gelatine, Antiadhäsionsmitteln sowie dem darin enthaltenen Wirkstoff IFN alpha und verschiedenen Zusatzstoffen zusammensetzen. Es wird jedoch vorausgesetzt, daß viele Modifikationen und Veränderungen durchführbar sind und den Gegenstand der Erfindung einschließen, ohne sich von dem dieser Erfindung zugrundeliegenden Umfang zu entfernen, und daß die aufgeführten Beispiele die Erfindung nicht einschränken.

In den Beispielen bedeuten:

Nipagin M = p-Hydroxybenzoesäuremethylester,

Polysorbat 20 = Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat (Tween®20);

Polysorbat 60 = Polyoxyethylen(20)sorbitanmonostearat (Tween®60),

Polysorbat 80 = Polyoxyethylen(20)sorbitanmonooleat (Tween®80),

Benzalkoniumchlorid = Mischung aus Alkyldimethylbenzylammoniumchloriden mit Alkylgruppen von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen,

Cetrimoniumbromid = Hexadecyltrimethylammoniumbromid.  
 $3,2 \times 10^8$  I.E. Interferon-alpha-2-arg entsprechen 1 mg dieser Substanz.

### Beispiel 1 (Hydrogel)

In 100 g Gelsubstanz sind enthalten :

|  |                    |
|--|--------------------|
| IFN alpha 2  | $1 \times 10^8$ IE |
| Nipagin M  | 0,20 g             |
| Gelatine, Bloom 160-200                                      | 0,50 g             |
| NaCl   | 0,48 g             |
| KCL  | 0,012 g            |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$       | 0,0593 g           |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$        | 0,0407 g           |
| Glutaminsäure-Na $\times \text{H}_2\text{O}$                 | 0,0636 g           |
| Polysorbat 20  | 0,1 g              |
| Hydroxyäthylcellulose (z.B.<br>Natrosol <sup>R</sup> 250 HX) | 1,75 g             |
| Wasser, deionisiert ad 100 g                                 | 96,7944 g          |

Die Präparation des IFN alpha 2 -Hydrogels erfolgt dadurch, daß Nipagin M in 80°C heißem Wasser gelöst und die Lösung anschließend auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt wird, wobei während der Abkühlphase die Gelatine in diese Lösung eingebracht wird. Nach der vollständigen Lösung der Gelatine werden bei RT konsekutiv NaCl, KCL,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ , Glutaminsäure-Na  $\times \text{H}_2\text{O}$  sowie Polysorbat 20 zu dieser Lösung dazugegeben. Nach anschließender Sterilfiltration wird mikrobiologisch reine Hydroxyäthylcellulose eingestreut und die Lösung unter Rühren wieder auf 80°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT wird unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, 1 % Polysorbat-haltige IFN alpha 2 -Lösung, bestehend aus einem in 0.01 N HCl gelöstem IFN alpha 2 -Lyophilisat, dazugegeben und homogen verteilt. Die Abfüllung dieses Gemisches erfolgt unter laminaren Air-flow-Bedingungen in sterile Aluminium-Tuben.

Beispiel 2 (Hydrogel)

5 In 100 g Gelsubstanz sind enthalten :

|    |   |                          |
|----|---|--------------------------|
|    | - IFN-alpha-2   | $1 \times 10^{10}$ I. E. |
| 10 | - Hydroxyäthylcellulose<br>(z. B. Natrosol <sup>R</sup> 250 HX) | 2, 0 g                   |
|    | - Gelatine, Bloom 160 - 200                                     | 0, 1 g                   |
|    | - NaCl  | 0,35 g                   |
| 15 | - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$          | 0,16 g                   |
|    | - $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                      | 0,09 g                   |
|    | - 1,2-Propylenglykol  | 10,00 g                  |
| 20 | - Polysorbat 80   | 0,1 g                    |
|    | - Benzalkoniumchlorid 90 %                                      | 0,02 g                   |
|    | - Wasser deion.   | ad 100 g                 |

25 Die Herstellung des IFN-alpha 2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß Benzalkoniumchlorid bei 30° C in dem Wasser gelöst wird, anschließend wird bei RT das Propylenglykol zugesetzt und die Gelatine in die Lösung eingebracht. Nach vollständiger Lösung der Gelatine werden bei RT nacheinander NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sowie Polysorbat 80 dazugegeben. Nach erfolgter Sterilfiltration wird mikrobiologisch reine Hydroxyäthylcellulose eingestreut und die Lösung unter Rühren 20 Min. auf 80° C erwärmt. Nach dem  
30 Abkühlen auf RT wird unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, polysorbathaltige IFN-alpha-2-Lösung, bestehend aus einem in 0,01N HCl und 0,1 % Polysorbat 80 gelöstem IFN-alpha-2-Lyophilisat, dazugegeben und homogen verteilt. Die Abfüllung dieses Gemisches erfolgt unter laminaren Air Flow-Bedingungen in sterilen Aluminiumtuben.

35

Beispiel 3 (Hydrogel)

40 In 100 g Gel-Substanz sind enthalten :

|    |   |                       |
|----|---|-----------------------|
|    | - IFN-alpha-2   | $1 \times 10^6$ I. E. |
| 45 | - Hydroxyäthylcellulose<br>(z. B. Natrosol <sup>R</sup> 250 HX) | 1,0 g                 |
|    | - Gelatine, Bloom 160 - 200                                     | 1,0 g                 |
|    | - Polysorbat 20   | 0,1 g                 |
| 50 | - Glycerin  | 5,0 g                 |
|    | - Bernsteinsäure  | 0,24 g                |
|    | - Chlorhexidindigluconat  | 0,05 g                |
| 55 | - 1N-NaOH (ad pH 6,0)   |                       |
|    | - Wasser, deion.  | ad 100,0 g            |

Die Herstellung des IFN-alpha-2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß Chlorhexidindigluconat, Glycerin und Gelatine bei ca. 30° C in Lösung gebracht werden. Anschließend wird Bernsteinsäure zugesetzt, mit IN NaOH auf pH 6,0 eingestellt und Polysorbat 20 zugegeben.

Dann wird mikrobiologisch reine Hydroxyäthylcellulose eingestreut und die Lösung unter Rühren 20 Min. auf 80° C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT wird unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, polysorbathaltige IFN-alpha-2-Lösung dazugegeben und homogen verteilt. Die Abfüllung erfolgt wie bei Beispiel 1 und 2.

#### Beispiel 4 (Hydrogel als Nasengel)

In 100 g Gel-Substanz sind enthalten :

|   |                           |
|---|---------------------------|
| - IFN-alpha-2   | 1 x 10 <sup>8</sup> I. E. |
| - Hydroxypropylmethylcellulose<br>(z. B. Methocel <sup>R</sup> Premium) | 0,1 g                     |
| - Polysorbat 60   | 0,1 g                     |
| - Gelatine, Bloom 160 - 200   | 0,5 g                     |
| - Sorbitlösung 70 %   | 2,0 g                     |
| - Citronensäure x H <sub>2</sub> O                                      | 0,130 g                   |
| - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O                 | 0,30 g                    |
| - NaCl  | 0,5 g                     |
| - Benzalkoniumchlorid 90 %  | 0,02 g                    |
| - Wasser deion.   | ad 100 g                  |

Die Herstellung des IFN-alpha-2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß in 40° C warmem Wasser die Hydroxypropylmethylcellulose unter Rühren gelöst wird. Anschließend wird auf RT abgekühlt, während der Abkühlphase wird Gelatine in die Lösung eingebracht. Nach erfolgter Lösung werden nacheinander eingetragen: Benzalkoniumchlorid, Sorbitlösung, Citronensäure, Di-Na-Hydrogenphosphat, NaCl und Polysorbat 60. In das fertige Gel wird bei RT unter vorsichtigem Rühren die salzsaure, 1 % Polysorbat-haltige IFN-alpha-2-Lösung eingebracht und homogen verteilt. Die Abfüllung erfolgt unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen in sterile Aluminium-Tuben.

Beispiel 5 (Hydrogel als Augengel)

5 In 100 g Gel-Substanz sind enthalten:

|    |                                   |                      |
|----|-----------------------------------|----------------------|
|    | -IFN-alpha-2                      | $1 \times 10^8$ I.E. |
| 10 | -Polyacrylsäure (MG: ca. 3 Mill.) | 0,1 g                |
|    | -Gelatine, Bloom 160 -200         | 0,3 g                |
|    | -Polysorbat 20                    | 0,1 g                |
| 15 | -Sorbitlösung 70 %                | 2,0 g                |
|    | -Glycerin                         | 1,0 g                |
|    | -NaCl                             | 0,1 g                |
|    | -Cetrimoniumbromid                | 0,01 g               |
| 20 | -1N-NaOH (ad pH 7,4)              |                      |
|    | -Wasser deion.                    | ad 100 g             |

25 Die Herstellung des IFN-alpha-2-Hydrogels erfolgt dadurch, daß die Polyacrylsäure und Gelatine in Wasser unter Rühren bei RT gelöst wird, anschließend werden nacheinander Sorbitlösung, Glycerin, NaCl, Cetrimoniumbromid und Polysorbat eingetragen. Nach vollständiger Lösung wird steril filtriert und unter Rühren bei RT auf ca. pH 7,6 mit Natronlauge eingestellt, dabei tritt die Gelierung ein. In dieses Gel wird bei RT dann unter vorsichtigem Rühren die salzsaure (0,001N), 1 % Polysorbat-haltige IFN-alpha-2-Lösung eingebracht und homogen verteilt. Die Abfüllung erfolgt wie in den bisherigen Beispielen unter Laminar-Air-Flow in sterile Aluminium-Tuben.

35 Beispiel 6 (Ovula)

In 100 g Ovula-Masse sind enthalten:

|    |  |                      |
|----|--|----------------------|
| 40 | -IFN-alpha-2   | $1 \times 10^8$ I.E. |
|    | -Hydroxyäthylcellulose                                 | 0,1 g                |
| 45 | -Gelatine, Bloom 160 -200                              | 10,0 g               |
|    | - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,16 g               |
|    | - $\text{KH}_2\text{HPO}_4$                            | 0,09 g               |
|    | -Polysorbat 20   | 0,1 g                |
| 50 | -Glycerin  | 57,0 g               |
|    | -Wasser deion.   | ad 100 g             |

55

Die Herstellung der IFN-alpha-2-Ovula erfolgt dadurch, daß die Hydroxyäthylcellulose zusammen mit der Gelatine im Glycerin-Wassergemisch, welches schon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sowie Polysorbat enthält bei ca. 40-50°C gelöst wird. Im noch viskosen Zustand (bei ca. 37-40°C) wird die 1 % Polysorbat-haltige, salzsaure (0,001N) IFN-alpha-2-Lösung vorsichtig eingerührt und die Lösung sofort zur Erstarrung in geeignete, gekühlte Formen ausgegossen.

Beispiel 7 (Stabilitätstests, Hydrogel ohne Gelatine-vs. mit Gelatine-Zusatz)

In 100 g Gelsubstanz sind enthalten:

|   | 1 x 10 <sup>8</sup> I.E. | 1 x 10 <sup>8</sup> I.E. |
|---|--------------------------|--------------------------|
| -IFN-alpha-2  |                          |                          |
| -Nipagin M  | 0,2 g                    | 0,2 g                    |
| -Gelatine, Bloom 160 -200                             | -                        | 0,5 g                    |
| -NaCl   | 0,48 g                   | 0,48 g                   |
| -KCl  | 0,012 g                  | 0,012 g                  |
| -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,086 g                  | 0,086 g                  |
| -KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O  | 0,012 g                  | 0,012 g                  |
| -Polysorbat 20  | 0,1 g                    | 0,1 g                    |
| -Hydroxyäthylcellulose                                | 2,0 g                    | 2,0 g                    |
| -(z. B. Natrosol <sup>R</sup> 250 HX)                 |                          |                          |
| -Wasser deion.  | ad 100 g                 |                          |

Die punktierten Kurven in Abb.1 bis 3 beschreiben den Stabilitätsverlauf eines IFN-alpha-2-Hydrogeles obiger Zusammensetzung ohne Gelatine-Zusatz, die durchgezogenen Kurven mit Gelatine-Zusatz abgefüllt in Aluminium-Tuben. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 6 Bestimmungen dar. Die Bestimmungen wurden mit dem ELISA-Test durchgeführt.

In Abbildung 1 ist der Stabilitätsverlauf bei Minus 10°C Lagerung, in Abbildung 2 bei Plus 4°C Lagerung und in Abbildung 3 bei Plus 21°C Lagerung, jeweils vergleichend, wiedergegeben.

Das Stabilitätsverhalten wurde über einen Zeitraum von 14 Wochen (= 3 1/2 Monate) verfolgt. Dabei konnte erstaunlicherweise und völlig unerwartet festgestellt werden, daß mit zunehmender Lagertemperatur die Stabilitätsunterschiede deutlicher wurden. Bei Summation der biologischen Stabilitätsergebnisse über den gesamten Zeitraum von 14 Wochen und Bildung des arithmetischen Mittels (x) der Werte (n = 11) ergibt sich das in der folgenden Tabelle dargestellte Bild, wobei ein Wert von 10,0 entsprechend 10<sup>8</sup> I.E. IFN-alpha-2 pro 100 g, als 100% Aktivität gesetzt wurde:

| Lager-<br>tempe-<br>ratur | Hydrogel<br>ohne Gelatinezusatz | Hydrogel<br>mit Gelatinezusatz  | Dif-<br>ferenz |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------|
| -10°C                     | $\bar{x}$ (11) = 8,49 (= -15%)  | $\bar{x}$ (11) = 9,72 (= -3%)   | 12%            |
| + 4°C                     | $\bar{x}$ (11) = 7,52 (= -25%)  | $\bar{x}$ (11) = 9,97 (= +/- 0) | 25%            |
| +21°C                     | $\bar{x}$ (11) = 5,67 (= -43%)  | $\bar{x}$ (11) = 8,87 (= -11%)  | 32%            |

Aus dieser Tabelle kann man deutlich die stabilisierende Wirkung der Kombination von Hydroxyäthylcellulose und Gelatine ablesen. Bei einer Lagerung im Kühlschrank (= plus 4°C) konnte praktisch keine Abnahme der Aktivität nach 3 1/2 Monaten der Formulierung mit Gelatinezusatz festgestellt werden, während die Formulierung ohne Gelatinezusatz einen Abfall von ca. 25 % zeigte. Kühlschranktemperatur stellt dabei eine praktikable Lagerung für ein Handelspräparat dar. Bei einer Lagerung bei 21°C war ein Aktivitätsverlust der Formulierung ohne Gelatinezusatz innerhalb des Lagerzeitraumes von 3 1/2 Monaten auf fast die Hälfte des Ausgangswertes festzustellen, während die erfindungsgemäße Formulierung mit Hydroxyäthylcellulose und Gelatine innerhalb dieses Zeitraumes nur einen Aktivitätsverlust von 11% aufwies, was einer relativen Stabilitätserhöhung von IFN alpha 2 von über 30% gleichkommt.

Ein weiterer Lagerungsversuch über 44 Wochen (10 Monate) einer Zubereitungsform nach Beispiel 1, abgefüllt in Aluminiumtuben mit Innenschutzlack, zeigte im Elisatest bei Lagertemperaturen von 4°C und 21°C keinen Aktivitätsabfall gegenüber dem Anfangswert.

30

| Lagertemperatur | Hydrogel gemäß Beispiel 1 |                         |
|-----------------|---------------------------|-------------------------|
|                 | Anfangswert               | Endwert nach 10 Monaten |
| + 4°C           | $\bar{x}$ (6) 9,6         | $\bar{x}$ (6) 11,0      |
| + 21°C          | $\bar{x}$ (6) 9,6         | $\bar{x}$ (6) 9,6       |

40

### Ansprüche

1. Pharmazeutische Zubereitungsformen für die topische Anwendung enthaltend Interferon alpha, dadurch gekennzeichnet, daß diese als Träger und Stabilisator für das Interferon alpha

1. Cellulosederivate, Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon oder Polyacrylsäure-Polymerisate oder Mischungen davon und

2. Gelatine, sauer oder alkalisch aufgeschlossen,

sowie zusätzlich ein Antiadhäsionsmittel und, gegebenenfalls, weitere übliche Hilfsstoffe enthalten.

2. Pharmazeutische Zubereitungsformen für die topische Anwendung enthaltend Interferon alpha nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß diese ein Hydrogel sind und als Träger und Stabilisator für das Interferon alpha

1. Cellulosederivate, Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon oder Polyacrylsäure-Polymerisate oder Mischungen davon und

2. Gelatine, sauer oder alkalisch aufgeschlossen,

sowie zusätzlich ein Antiadhäsionsmittel und, gegebenenfalls, weitere übliche Hilfsstoffe enthalten.

3. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese als Träger und Stabilisator Hydroxyäthylcellulose und Gelatine enthalten, jeweils in einer auf das fertige Produkt bezogenen Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.-%.

5 4. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß diese als Träger und Stabilisator Hydroxyäthylcellulose und Gelatine enthalten, wobei die auf das fertige Produkt bezogene Menge an Gelatine von 0,1 bis 10 Gew.-% beträgt.

5. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Antiadhäsionsmittel aus anionaktiven, kationaktiven oder neutralen oberflächenaktiven Substanzen, vorzugsweise aus polyäthoxylierten Sorbitan-Estern besteht.

10 6. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das darin enthaltene Interferon alpha aus einer Zellkultur erhalten wird, die mit einer für Human Interferon alpha codierenden DNA-Sequenz transformiert wurde.

7. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß diese als zusätzliche Hilfsstoffe ein Puffersystem für einen pH-Bereich von 6,0 bis 7,4, Feuchthaltesubstanzen, hautverträgliche Konservierungsmittel, Interferon alpha - kompatible Penetrationsförderer und ein Vehikel enthalten.

8. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es als Feuchthaltesubstanzen Glycerin, 1,2-Propylenglykol, Sorbit, Butylenglykol, ein Polyol wie Polyethylenglykol 400 oder ein Gemisch davon enthält.

20 9. Pharmazeutische Zubereitungsformen nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der für Interferon alpha kompatible Penetrationsförderer bis zu 50 Gew.-% Dimethylsulfoxid ist.

10. Anwendung von pharmazeutischen Zubereitungsformen nach Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß diese sowohl als Virusstatika im dermalen, nasalen, opthalmischen und intravaginalen Bereich bei Herpes labialis, Herpes genitalis inclusive Papilloma-Infektionen, Warzen und bei Herpes Zoster-  
25 Infektionen als auch zur topischen Behandlung von Paracancerosen und Cancerosen eingesetzt werden.

11. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungsformen gemäß Anspruch 1 für die topische Anwendung mit Stabilisierung des darin enthaltenen Interferon alpha, dadurch gekennzeichnet, daß

a. Gelatine, in einer auf das fertige Produkt bezogenen Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.-% in bis zu 80°C heißem Wasser gelöst wird und in diese Lösung das Antiadhäsionsmittel zugegeben wird,

30 b. in diese Lösung gegebenenfalls Konservierungsmittel und Feuchthalter, Salze, Puffersysteme und Penetrationsförderer eingebracht werden,

c. in diese Lösung bei bis zu 80°C Hydroxyäthylcellulose oder Carboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure oder ein Gemisch davon vorzugsweise in einer auf das fertige Produkt bezogenen Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.-%, bei  
35 Polyvinylalkoholen oder Polyvinylpyrrolidon bis zu 15 Gew.-%, eingebracht werden,

d. Interferon alpha in einer Menge von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^{10}$  IE/100 g fertiges Produkt, darin homogen verteilt und diese Mischung steril abgefüllt wird.

12. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungsformen gemäß Anspruch 1 für die intravaginale Applikation, dadurch gekennzeichnet, daß

40 a. Hydroxyäthylcellulose in einer Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.-% zusammen mit Gelatine in einer Menge bis zu 10 Gew.-% bei Temperaturen bis zu 60°C in einem Wasser-Glycerin-Gemisch gelöst werden, und

b. bei einer Temperatur von 40 bis 50°C die Polysorbat-haltige salzsaure IFN alpha-Lösung vorsichtig eingerührt und

45 c. diese Lösung sofort in geeignete Formen ausgegossen wird.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: AT, GR, ES

1.) Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungsformen für die topische Anwendung enthaltend Interferon alpha und Träger und Stabilisatoren für Interferon alpha, desweiteren Antiadhäsionsmittel und, gegebenenfalls, weitere Hilfsstoffe, dadurch gekennzeichnet, daß

50 a. Gelatine, in einer auf das fertige Produkt bezogenen Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.-% in bis zu 80°C heißem Wasser gelöst wird und in diese Lösung das Antiadhäsionsmittel zugegeben wird,

b. in diese Lösung gegebenenfalls Konservierungsmittel und Feuchthalter, Salze, Puffersysteme und  
55 Penetrationsförderer eingebracht werden,

c. in diese Lösung bei bis zu 80°C Hydroxyäthylcellulose oder Carboxymethylcellulose, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Polyvinylalkohole, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäure oder ein Gemisch davon vorzugsweise in einer auf das fertige Produkt bezogenen Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.%, bei Polyvinylalkoholen oder Polyvinylpyrrolidon bis zu 15 Gew.%, eingebracht werden.

5 d. Interferon alpha in einer Menge von  $1 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^{10}$  IE/100 g fertiges Produkt, darin homogen verteilt und diese Mischung steril abgefüllt wird.

2. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungsformen gemäß Anspruch 1 für die intravaginale Applikation, dadurch gekennzeichnet, daß

10 a. Hydroxyäthylcellulose in einer Menge von 0,1 bis 2,0 Gew.% zusammen mit Gelatine in einer Menge bis zu 10 Gew.% bei Temperaturen bis zu 60°C in einem Wasser-Glycerin-Gemisch gelöst werden, und

b. bei einer Temperatur von 40 bis 50°C die Polysorbat-haltige salzsaure IFN alpha-Lösung vorsichtig eingerührt und

c. diese Lösung sofort in geeignete Formen ausgegossen wird.

15 3.) Verfahren gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger und Stabilisatoren für Interferon alpha Cellulosederivate und Mischungen davon zusammen mit sauer oder alkalisch aufgeschlossener Gelatine, als Antiadhäsionsmittel anionaktive, kationaktive und/oder neutrale oberflächenaktive Substanzen, desweiteren anorganische oder organische Puffer für einen pH-Bereich von 6,0 bis 7,4, Feuchthaltesubstanzen und gegebenenfalls Konservierungsstoffe und Penetrationsförderer eingearbeitet werden.

20 4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß als oberflächenaktive Substanzen polyäthoxylierte Sorbitan-Ester, als Puffer Natriumphosphat-Puffer, Kaliumhydrogenphosphat-Natriumdihydrogenphosphat-Puffer, Zitronensäurephosphat-Puffer, Kalium-Natrium-glutamat-phosphat-Puffer und Succinat-Puffer, als Feuchthaltesubstanzen Glycerin, 1,2-Propylenglykol, Sorbit, Butylenglykol, Polyole, gegebenfalls, als Penetrationsförderer Dimethylsulfoxid, und als Vehikel Wasser, sofern nichtalkoholische Hydrogele vorliegen, eingearbeitet werden.

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

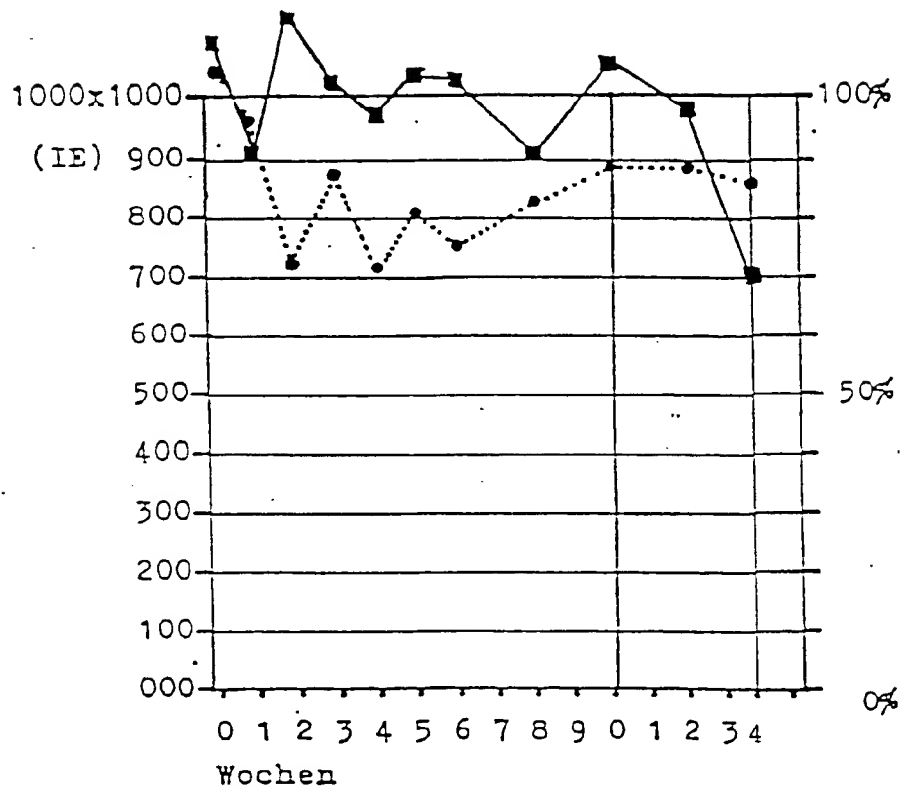


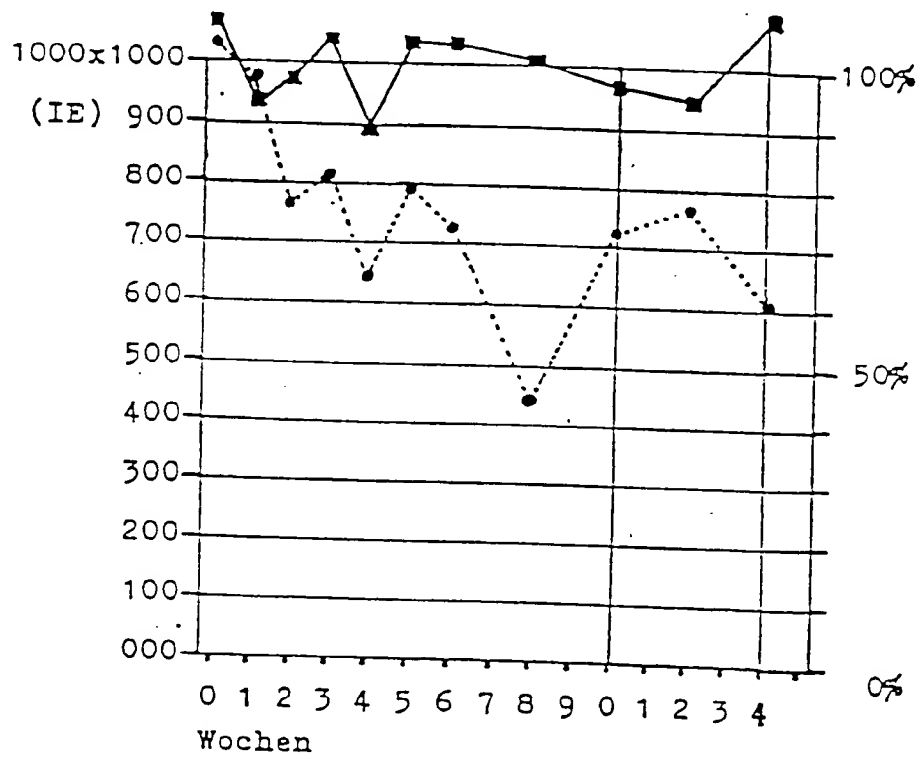
Abbildung 2

Abbildung 3